

COMPOSITION FOR SPECIFIC DETERMINATION OF HDL CHOLESTEROL AND DETERMINATION

Patent Number: JP9121895

Publication date: 1997-05-13

Inventor(s): KAZAHAYA KENJI; HAMA MICHIO; TANAKA MITSUNAO

Applicant(s):: IATRON LAB INC

Requested Patent: JP9121895

Application Number: JP19960248722 19960830

Priority Number(s):

IPC Classification: C12Q1/60

EC Classification:

Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a composition for determining HDL cholesterol through simplified operations by formulating carageenan to a reagent for detecting the substance formed by bringing a sample into contact with cholesterol esterase and cholesterol oxidase.

SOLUTION: As for this reagent composition for determining high-density lipoprotein(HDL) cholesterol, the HDL in a living body sample is brought into contact with cholesterol esterase and cholesterol oxidase to form hydrogen peroxide by the reactions of this cholesterol with individual enzymes, and the formed hydrogen peroxide is determined by using a reagent consisting of peroxidase, 4-aminoantipyrine and N-ethyl-N-sulfopropyl-m-toluidine and the like, and at least one of carageenan, a copolymer of (meth)acrylic acid with lauryl acrylate, and octylthioglucoside is added to the reagent to specifically determine the objective HDL cholesterol without centrifugal operation of the sample.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

A handwritten signature in black ink, appearing to read "D. J. Heale".

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09121895 A**

(43) Date of publication of application: **13 . 05 . 97**

(51) Int. Cl

C12Q 1/60

(21) Application number: **08248722**

(71) Applicant: **IATRON LAB INC**

(22) Date of filing: **30 . 08 . 96**

(72) Inventor: **KAZAHAYA KENJI**

(30) Priority: **31 . 08 . 95 JP 07246583**

HAMA MICHO

TANAKA MITSUNAO

**(54) COMPOSITION FOR SPECIFIC DETERMINATION
OF HDL CHOLESTEROL AND DETERMINATION**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a composition for determining HDL cholesterol through simplified operations by formulating carageenan to a reagent for detecting the substance formed by bringing a sample into contact with cholesterol esterase and cholesterol oxidase.

SOLUTION: As for this reagent composition for determining high-density lipoprotein(HDL) cholesterol, the HDL in a living body sample is brought into contact

with choloesterol esterase and cholesterol oxidase to form hydrogen peroxide by the reactions of this cholesterol with individual enzymes, and the formed hydrogen peroxide is determined by using a reagent consisting of peroxidase, 4-aminoantipyrine and N-ethyl-N-sulfopropyl-m-toluidine and the like, and at least one of carageenan, a copolymer of (meth)acrylic acid with lauryl acrylate, and octylthioglucoside is added to the reagent to specifically determine the objective HDL cholesterol without centrifugal operation of the sample.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-121895

(43)公開日 平成9年(1997)5月13日

(51)Int.Cl.⁶
C 1 2 Q 1/60

識別記号 庁内整理番号
7823-4B

F I
C 1 2 Q 1/60

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数6 FD (全10頁)

(21)出願番号 特願平8-248722

(22)出願日 平成8年(1996)8月30日

(31)優先権主張番号 特願平7-246583

(32)優先日 平7(1995)8月31日

(33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 000138277

株式会社ヤトロン

東京都千代田区東神田1丁目11番4号

(72)発明者 風早 健司

東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株

式会社ヤトロン内

(72)発明者 濱 三知夫

東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株

式会社ヤトロン内

(72)発明者 田中 満直

東京都千代田区東神田1丁目11番4号 株

式会社ヤトロン内

(74)代理人 弁理士 森田 勲一

(54)【発明の名称】 HDLコレステロールの特異的測定用組成物及び測定方法

(57)【要約】

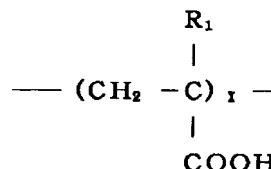
【課題】 高密度リポタンパク質 (HDL) コレステロールの測定用組成物及び測定方法を提供する。

【解決手段】 組成物は、生体試料中のHDLコレステロールとコレステロールエステラーゼ及びオキシダーゼとを接触させ、酵素反応による消費又は生成化合物を測定する試薬組成物において、カラギナン、アクリル酸/メタクリル酸とラウリルアクリレートとのコポリマー、又はオクチルチオグルコシドからなる群から選択される化合物を含有する。方法は、分画操作を行っていない被検試料と前記化合物を接触させる。

【効果】 試料(血清又は血漿)の遠心操作が不要である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生体試料中の高密度リポタンパク質コレステロールとコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼとを接触させ、前記コレステロールと前記各酵素との酵素反応により消費される化合物又は生成される化合物を測定して、高密度リポタンパク質コレステロールを特異的に定量するための試薬組成物において、(1)カラギナン、(2)アクリル酸又はメタク*



[但し、R₁は水素原子又はメチル基であり、R₂は-(CH₂)_n-CH₃基であり、xは、R₁が水素原子である場合には、65~89であり、R₁がメチル基である場合には、78~93である]で表される化合物又はその塩である請求項1に記載の組成物。

【請求項3】 更に、アルカリ土類金属イオンを含有する請求項1に記載の組成物。

【請求項4】 酵素反応生成物が過酸化水素であり、この過酸化水素から色素を形成させて検出する検出試薬として、ペルオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン、及びN-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン又は3-ヒドロキシ-2, 4, 6-トリヨード安息香酸を含有する請求項1に記載の組成物。

【請求項5】 生体試料中の高密度リポタンパク質コレステロールとコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼとを接触させ、前記コレステロールと前記各酵素との酵素反応により消費される化合物又は生成される化合物を測定して、高密度リポタンパク質コレステロールを特異的に定量する方法において、(1)カラギナン、(2)アクリル酸又はメタクリル酸とラウリルアクリレートとのコポリマー、及び(3)オクチルチオグルコシドからなる群から選択される化合物少なくとも1種を、分画操作を行っていない被検試料と接触させ、高密度リポタンパク質コレステロールとコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼとの酵素反応により消費される化合物又は生成される化合物を測定することを特徴とする、高密度リポタンパク質コレステロールの特異的測定方法。

【請求項6】 更に、アルカリ土類金属イオンを共存させる請求項5に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

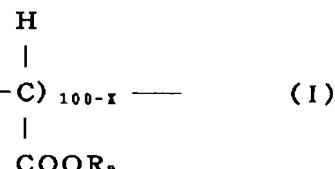
【発明の属する技術分野】 本発明は、高密度リポタンパク質(HDL)コレステロールの特異的測定用組成物及び測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 血漿又は血清中の各リピドフラクション

* リル酸とラウリルアクリレートとのコポリマー、及び(3)オクチルチオグルコシドからなる群から選択される化合物少なくとも1種を含有することを特徴とする、高密度リポタンパク質コレステロールの特異的測定用組成物。

【請求項2】 アクリル酸又はメタクリル酸とラウリルアクリレートとのコポリマーが、一般式(I)：



中に含有されるコレステロールは、近年アテローム性動脈硬化症や心筋梗塞の危険度を示す診断材料として重要視されている。血清のリピドフラクションはそれぞれ脂質複合体粒子としての大きさが異なり、比重の差を利用した分離法である超遠心法に従って、カイロミクロン、超低密度リポプロテイン (Very low density lipoprotein; 以下VLDLともいう)、低密度リポプロテイン (Low density lipoprotein; 以下LDLともいう)、及び高密度リポプロテイン (High density lipoprotein; 以下HDLともいう)の4種類に分別されている。

各リピドフラクションは、アポリポタンパク質と脂質に大別され、脂質は更に遊離型コレステロール、エステル型コレステロール、トリグリセリド及びリン脂質から構成されている。このため、コレステロールの測定は遊離型とエステル型の両者について行われている。

【0003】 日常的な臨床検査では、自動分析装置を使用して酵素法による総コレステロールの測定が広く行われているが、リピドフラクションについては、試料の前処理(分画・分離操作)を行うことが必要なため、酵素法による自動分析測定(自動化)の普及が遅れていた。

この試料の前処理としては、種々の沈殿法が行われており、例えばリンタングステン酸とマグネシウムイオン、デキストラサンサルフェートとマグネシウムイオン、ヘパリンとカルシウムイオンあるいはマンガンイオン(M. B urstein and H. R. Scholnick; Adv. Lipid Res., 11, 67, 1973, G. R. Warnick et al.; Clin. Chem., 25, 5 96, 1979)、又はポリエチレングリコールを添加してLDL等を沈殿させて遠心操作によって上澄み液を被検試料とする方法が頻用されている。詳細には、沈殿剤としてリンタングステン酸とマグネシウムイオンを使った場合、これらを含む溶液に試料(血清や血漿)を加え、HDL以外のリピドフラクションを不溶性の複合体とする。これを遠心分離することによって沈殿を除き、HDLを含む上清を回収する。分画されたHDLは総コレステロール測定用の酵素試薬で自動分析システムによる測定が可能となる。また、免疫法(C-C. Heuck, 31, 252, 1985)においても沈殿剤としてアポリポタンパク質B

(HDLには含まれない)に対する抗体を試料(血清や血漿)に加え、HDL以外のリピドフラクションを沈殿させる。以下同様に分画した後、はじめて上清中のHDL含有コレステロールの測定を行うことができる。このように、従来の方法ではいずれも多くの工程と時間を要するという欠点があった。

【0004】最近、これら分画操作を必要としない測定法について報告が出されている(例えば、特公平6-16720号、特公平7-34760号、特開昭58-165800号各公報)。すなわち、従来より用いられている総コレステロール測定のための酵素法としては、コレステロールエステラーゼによりコレステロールエステルを加水分解し、この酵素反応生成物であるコレステロールをコレステロールオキシダーゼにより、溶存酸素を使って酸化反応を行わせて生成される過酸化水素を、適当な被酸化性発色剤の存在下でペルオキシダーゼ反応により発色させて比色定量したり、あるいは、前記のコレステロールオキシダーゼによる酸化反応の際に消費される溶存酸素量を酸素電極で測定する方法が知られていた。

【0005】例えば、前記の各特許公報の記載によれば、前記の反応系において胆汁酸塩と共に非イオン系のポリエチレンオキシド基含有界面活性剤の存在はコレステロールエステラーゼの活性発現に重要であり、この界面活性剤なしには活性を発現しないとされている。そして、特公平6-16720号公報には、この胆汁酸塩には、脂質が豊富で比較的わずかなタンパク質を有するリポタンパク質である乳び脂粒、VLDL及びLDLのみを溶かし、その中に含有されるコレステロールを酵素反応に関与させる効果があるため、HDLコレステロールの測定にさきがけて、これを反応させ、次いで前記の界面活性剤を添加し、HDLフラクション中に含有されるコレステロールと酵素とを反応させることによってHDLコレステロールを特異的に分別測定する方法が記載されている。また、特公平7-34760号公報には、前記と同様の系において、更に、使用する酵素を臍臍由來のコレステロールエステラーゼとし、抗LDL抗体を反応系へ添加しておくことにより、LDLやVLDLの主要構成タンパク質であるアポリポタンパク質Bと前記抗体との間に抗原抗体反応による複合体を形成させ、当該酵素との反応を阻害することで総合的にHDLフラクションに対する特異性を上げる工夫を行っている。しかし、これらの方法は試薬へ新たに抗体を添加したり、反応時間が20分以上かかるなど、製造コストや測定操作上、日常使われている自動分析機への対応が不十分なものであった。

【0006】他方、H. Sugiuchiら(Clin. Chem., 41, 717, 1995)は自動分析機へ適応した新しい方法について報告している。すなわち、使用する当該酵素(コレステロールエステラーゼ、及びコレステロールオキシダーゼ)にポリエチレングリコールを結合させ、化学修飾して高分子化した酵素を用いるものである。更に、前記の高分子化酵素に加えて、種々のリピドフラクションと親和性があるとされるシクロデキストリン誘導体(具体的には、硫酸化 α -シクロデキストリン)を共存させることでHDL以外のリピドフラクションに対して複合体を形成させることができることが記載されている。この複合体は、前記高分子化酵素による反応を受けにくいためHDLフラクションを特異的に測定することができる。

10 しかし、このような手段を採用した場合、酵素の修飾は新たな工程の増加と、酵素標品の精製度の管理や化学修飾の程度差による酵素活性変動の抑制と管理、更には修飾酵素の安定性の維持等、新たな問題点を付随することになる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明者等は、現在の臨床検査試験では、迅速で簡便な手段である自動分析装置による測定が主流である点を鑑み、HDLコレステロールの測定方法において、試料(血清又は血漿)の遠心操作を行うことなく簡便な操作で、且つ高精度の測定結果が得られる方法の開発を目的として、鋭意研究を重ねた結果、HDLコレステロールの測定方法において利用する酵素(コレステロールエステラーゼ、及びコレステロールオキシダーゼ)とリピドフラクション含有コレステロールとの反応に関して、HDLフラクションのコレステロールとの反応には影響しないが、LDL及びVLDLフラクションのコレステロールとの反応を阻害する化合物が存在することを見出し、これらの化合物を用いることにより、試料(血清又は血漿)の遠心操作を行うことなく簡便な操作で、HDLコレステロールを高精度に測定することができるを見出した。本発明は、こうした知見に基づくものである。

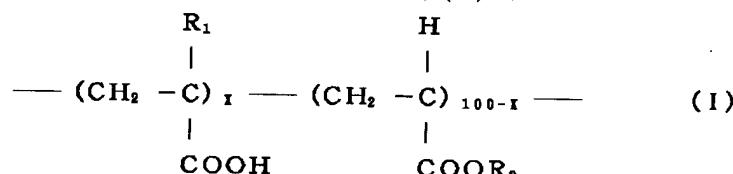
【0008】

【課題を解決するための手段】従って、本発明は、生体試料中の高密度リポタンパク質コレステロールとコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼとを接触させ、前記コレステロールと前記各酵素との酵素反応により消費される化合物又は生成される化合物を測定して、高密度リポタンパク質コレステロールを特異的に定量するための試薬組成物において、(1)カラギナン、(2)アクリル酸又はメタクリル酸とラウリルアクリレートとのコポリマー、及び(3)オクチルチオグルコシドからなる群から選択される化合物少なくとも1種を含有することを特徴とする、高密度リポタンパク質コレステロールの特異的測定用組成物に関する。また、本発明は、生体試料中の高密度リポタンパク質コレステロールとコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼとを接触させ、前記コレステロールと前記各酵素との酵素反応により消費される化合物又は生成される化合物を測定して、高密度リポタンパク質コレ

テロールを特異的に定量する方法において、(1)カラギナン、(2)アクリル酸又はメタクリル酸とラウリルアクリレートとのコポリマー、及び(3)オクチルチオグルコシドからなる群から選択される化合物少なくとも1種を、分画操作を行っていない被検試料と接触させ、高密度リポタンパク質コレステロールとコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼとの酵素反応により消費される化合物又は生成される化合物を測定することを特徴とする、高密度リポタンパク質コレステロールの特異的測定方法にも関する。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明においては、生体試料として、特に哺乳動物（特にヒト）の血清又は血漿をそのまま用いることができる。すなわち、血清又は血漿を分画処理したり、抗体で処理する必要がない。また、本発明においては、前記の生体試料をコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼと接触させる際に、それらの酵素とHDLコレステロールとの反応には*



〔但し、 R_1 は水素原子又はメチル基であり、 R_2 は $(\text{CH}_2)_n - \text{CH}_3$ 基であり、 x は、 R_1 が水素原子である場合には、65～89、好ましくは70～80であり、 R_1 がメチル基である場合には、78～93であり、好ましくは83～93である〕で表される化合物又はその塩を用いることができる。なお、一般式(I)において、アクリル酸繰り返し単位とメタクリル酸繰り返し単位は、それぞれアトランダムにコポリマー内に含まれている。前記一般式(I)で表されるコポリマーの塩は、例えば、アルカリ金属（例えば、ナトリウム、又はカリウム）の塩を挙げることができる。

【0012】オクチルチオグルコシドは、 n -オクチル- β -D-チオグルコピラノシドである。本発明においては、前記のカラギナン、CLA、MALA、又はオクチルチオグルコシドを単独で又は2種以上を任意に組み合わせて用いることができる。

【0013】なお、本発明において、カラギナン以外のアニオン性多糖類、例えば、ヒアルロン酸及びその誘導体、アルギン酸及びその誘導体、コンドロイチン硫酸、ペパラン硫酸及びその誘導体、カラギナンの誘導体、カルボキシメチルセルロース、リン酸化セルロース、硫酸化セルロース、カルボキシメチルキチン、硫酸化キチン、デキストラン硫酸などは、ブロッカーとしての作用を示さない。また、前記のCLA又はMALA以外のアニオン性ポリマー、例えば、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、アクリル酸とオクチルアクリレートとのコポリマー、ポリスチレンスルホン酸、スチレンスルホン酸

40

50

*影響しないが、LDLコレステロール及びVLDLコレステロールとの反応を阻害する化合物（以下、ブロッカーと称することがある）として、(1)カラギナン、(2)アクリル酸とラウリルアクリレートとのコポリマー(CLA)、若しくはメタクリル酸とラウリルアクリレートとのコポリマー(MALA)、又は(3)オクチルチオグルコシドの少なくとも1種を共存させる。

【0010】カラギナンは、硫酸基を結合したガラクトース及び3,6-アンヒドロガラクトースからなるアニオン性天然多糖類であり、水溶性やゲル化性などの物理的性質が異なる ι 型、 λ 型及び κ 型が存在する。本発明では、これらの ι 型、 λ 型及び κ 型のいずれも用いることができるが、 ι 型及び λ 型が好ましい。

【0011】アニオン性合成高分子化合物であるアクリル酸とラウリルアクリレートとのコポリマー(CLA)、若しくはメタクリル酸とラウリルアクリレートとのコポリマー(MALA)としては、好ましくは、一般式(I)：

H

|

 $(\text{CH}_2 - \text{C})_{100-x}$

|

 COOR_2

(I)

と2-エチルヘキシルアクリレートとのコポリマー、ステレンスルホン酸とラウリルアクリレートとのコポリマーなども、ブロッカーとしての作用を示さない。

【0014】更に、オクチルチオグルコシド以外のアルキル基含有糖類、例えば、オクチルグルコシド、ヘプチルチオグルコシド、ドデシルマルトシド、シュークロースモノカブレイトなども、ブロッカーとしての作用を示さない。更にまた、カチオン性ポリマー、例えば、ポリ[(ジメチルイミニオ)ヘキサメチレン(ジメチルイミニオ)メチレン-1、4-フェニレンメチレンジクロライド]、ポリ[(ジメチルイミニオ)エチレン(ジメチルイミニオ)メチレン-1、4-フェニレンメチレンジクロライド]、ポリ(ビニルベンジルトリメチルアンモニウムクロライド)、ポリ(トリメチルアリルアンモニウムクロライド)など；カチオン性多糖類、例えば、キトサン、脱アセチル化キトサン；中性多糖類、例えば、デキストラン、セルロース、マンナン、アガロース等、他にこれらの中性多糖類のジエチルアミノエチル誘導体；及びヘパリンなども、ブロッカーとしての作用を示さない。

【0015】本発明において、ブロッカーは、水溶液として用いるのが好ましい。水溶液中のブロッカー濃度は、好ましくは0.0002重量%～1.0重量%、より好ましくは0.0005重量%～0.5重量%、最も好ましくは0.001重量%～0.2重量%である。ブロッカーの濃度が0.0002重量%より少ないと、LDL及びVLDLフラクションのコレステロールとの酵

素反応に対する阻害効果が見られず、正確な測定を行うことができない。逆に1.0重量%を越える濃度では、フラクションのコレステロールとの酵素反応に対する特異性が全く見られなくなり、またブロッカーの溶解度が悪化する。

【0016】コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼとしては、ポリエチレングリコール(PEG)等を結合させて化学修飾した酵素、又は化学修飾していない酵素のいずれも用いることができる。酵素の由来も限定されず、コレステロールエステラーゼとしては、例えば、シードモナス属の微生物や、牛又は豚の臍臓由来のコレステロールエステラーゼを用いることができる。コレステロールエステラーゼとして微生物由来のコレステロールエステラーゼを使用した場合に、前記のブロッカーは特に有効である。また、コレステロールオキシダーゼとしては、例えば、ストレプトマイセス属又はノカルディヤ属の微生物由来のコレステロールオキシダーゼを用いることができる。それらの酵素の添加量も特に限定されないが、例えば、好ましくは0.1u/m1~90u/m1、より好ましくは0.2u/m1~20u/m1である。

【0017】本発明において、前記のブロッカーに加えて、アルカリ土類金属イオンを更に存在させると、リビドフラクションのコレステロールに対する前記酵素の特異性が向上するので好ましい。アルカリ土類金属は、特に限定されないが、マグネシウム、カルシウム、ストロンチウム、又はバリウムを用いることができ、マグネシウムが好ましい。アルカリ土類金属イオンは、水溶性無機塩、例えば、ハロゲン化物(例えば、塩化物、臭化物、又はヨウ化物)又は硫酸化物、あるいは、水溶性有機塩、例えば、酢酸塩又はクエン酸塩として用いることができる。アルカリ土類金属イオンは、好ましくは5~300mM、より好ましくは10~150mMの量で用いることができる。

【0018】本発明によれば、被検試料(血清又は血漿)について遠心分離等の操作を行わずに、前記のブロッカーを、場合によりアルカリ土類金属の存在下に、被検試料(血清又は血漿)と接触(共存)させ、被検試料中のLDLコレステロール及びVLDLコレステロールと酵素との反応を阻害するとともに、HDLコレステロールと酵素との反応は阻害せずに進行させ、コレステロール

* ルと前記各酵素との酵素反応により消費される化合物(例えば、酸素)又は生成される化合物(例えば、過酸化水素)を、公知の手段により検出し、HDLコレステロールを定量することができる。例えば、過酸化水素を検出する場合には、適当な被酸化性発色剤とペルオキシダーゼの存在下に生成するH₂O₂を発色させて、分光学的に比色測定する。

【0019】H₂O₂は、公知の方法で、例えば、適当な被酸化性発色剤の存在下にペルオキシダーゼの反応により発色させることができる。被酸化性発色剤としては、3-ハイドロキシ-2, 4, 6-トリヨードベンジックアシド(HТИBA)やN-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン(ESPT)と4-アミノアンチピリン(4-AP)が好適であり、HTIBAやESPTは0.1mM~5mMの濃度範囲で、そして4-APは0.05mM~2mMの濃度範囲で適宜含有させることができる。自動分析装置による測定では、波長510nm(HTIBAを使用する場合)、又は546nm(ESPTを使用する場合)における吸光度を測定すればよい。

【0020】本発明のHDLコレステロール測定用試薬を、現在汎用されている自動分析装置に合わせて、2試薬系にすることができる。この場合、第一試薬にブロッカー及び場合によりアルカリ土類金属を含有させ、第二試薬にコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼを含有させることができる。第一試薬及び第二試薬の緩衝剤としては、リン酸緩衝液、BES、HEPES、PIPESなどのグッド緩衝液、トリス緩衝液、イミダゾール緩衝液等を使用することができる。緩衝液の濃度としては、好ましくは10~1000mM、より好ましくは20~500mM、最も好ましくは20~200mMである。また、それらの緩衝液のpHは、好ましくは6.0~8.0、より好ましくはLDLのコレステロール及びVLDLのコレステロールと酵素との阻害が良好なpH6.5~8.0の範囲内で適宜選択することができる。アルキル土類金属イオンは、第一試薬及び/又は第二試薬に含有させることができるが、第一試薬に含有させることが好ましい。

【0021】2試薬系の本発明試薬を用いて、HDLコレステロールを測定する場合の反応系を模式的に示せば以下のとおりである。

第一試薬(ブロッカー含有)+被検試料(血清/血漿)

↓ LDL, VLDLのブロッカ化

第二試薬(酵素及び発色系構成成分含有)

(コレステロールエステラーゼ反応)

コレステロールエステル+H₂O→コレステロール+脂肪酸 (1)

(コレステロールオキシダーゼ反応)

コレステロール+O₂→△4-コレステン-3-オン+H₂O₂ (2)

(ペルオキシダーゼ反応)

H₂O₂+被酸化性発色剤→酸化縮合物 (3)

↓
吸光度測定

【0022】自動分析装置による測定では、主に前記反応式(2)で生成するH₂O₂を比色法によって測定するが、これら溶液中での反応だけでなく、例えば、濾紙試験片などによる乾式測定系(ドライケミストリー)でも同様に用いることができる。また、このH₂O₂は、フェロシアン化カリウムなどの適当なメディエーターとペルオキシダーゼの存在下に反応させることにより、生成する酸化電位差を電気化学的に測定することもできる。他方、酵素反応により消費される化合物、例えば、前記反応式(2)で消費される酸素(溶存酸素)を、従来公知の方法、例えば、酸素電極で測定することもできる。また、酵素反応により生成される化合物としては、前記の過酸化水素以外にも、例えば、前記反応式(1)の生成物である脂肪酸、あるいは前記反応式(2)の生成物である△4-コレステン-3-オンを適当な方法で測定してもよい。

【0023】

【作用】以下の説明に限定されるものではないが、本発明においては、HDLコレステロールの測定方法において利用する酵素(コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼ)とリピドフラクション含有コレステロールとの反応に際して、前記のブロッカーとして用いる化合物が、直接にリピドフラクションのアポリポタンパク質に親和性を示すか、あるいは間接的にリピドフラクションのコレステロールと酵素との反応時に酵素と相互作用するものと考えられる。すなわち、各リピドフラクションは、脂質とアポリポタンパク質とからなる脂質複合体となっているが、その脂質構成比の違いとアポリポタンパク質のタイプ(A-1, A-2, B-100, B-48, C, Eなど)の差による物理化学的性質及び量的(被検試料中に含まれる量)な違いによって識別される。HDLフラクションとLDL及びVLDLフラクションとの間で最も大きく異なるアポリポタンパク質のタイプ(前者がA-1, A-2、後者がB-100, C, E)の違いが明らかなため、従来、アポリポタンパク質に対する抗体を用いる方法も開発されてきた。この従来法はアポリポタンパク質B及びCに対する抗体を試料に混和し、免疫複合体を形成させることが特徴である。この免疫複合体は酵素反応阻害を惹起するため、次に酵素を加えるとHDLコレステロールのみが酵素と反応するので、HDLコレステロールのみを測定することができる。しかし、免疫複合体を形成することができる抗体の反応性を一定に維持することは難しく、また免疫複合体自体の濁りが著しいため、コレステロール測定のための比色定量に際して誤差が大きくなるという欠点があった。これに対し、本発明では、前記のブロッカーがアポリポタンパク質を中心とする脂質複合体と相互に作用し、コレステロールエステラーゼ及びコレステロー

10

ルオキシダーゼによる、各リピドフラクションのコレステロールに対する反応性を特異的に変化させることができ、しかも、前記のブロッカーは、抗体とは異なり、安定な化合物である。

【0024】

【実施例】以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例1：超遠心法によるリピドフラクションの分画
超遠心法による脂質フラクションの分画は、工藤明生等(動脈硬化、6, 39, 1978)の方法に準じて行った。具体的には、プール血清16mlへ、EDTAナトリウム塩16mg、ショ糖4g、臭化カリウム3.2g、及び塩化ナトリウム0.8gを加え溶解した。これとは別に3種類の比重液を作成した。すなわち、比重1.21の比重液は、ショ糖20g、臭化カリウム15g、及び塩化ナトリウム5gを精製水100mlに溶解して調製した。比重1.063の比重液は、比重1.21の前記比重液30mlと精製水70mlを混和して調製した。また比重1.006の比重液は、ショ糖2.5gを精製水97.5mlに溶解して調製した。10ml容量の遠心管に上記の血清1.9mlを入れ、この上層に比重1.21の比重液0.8mlを注射器で静かに重層し、遠心管を10℃で50000rpm20時間遠心した。遠心処理終了後、最上層部には比重1.21以下の全てのリピドフラクションが集まるが、この最上層部の上に更に比重1.063の比重液1.6mlと比重1.006の比重液2mlとを重層した。この遠心管を50000rpmで4時間更に遠心し、各リピドフラクションを回収した。各画分は生理的食塩水に一夜透析後(冷蔵下)、冷蔵保存した。

【0025】実施例2：ブロッカーの検索例
実施例1で得られたリピドフラクションのうち、LDLの10μl、及びHDLの20μlに、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)0.3ml、50mM-3-ヒドロキシ-2,4,6-トリヨードベンゾイックアシド(HТИBA)溶液0.02ml、及び被検物質(ブロッカーなど)水溶液0.43mlを添加し、37℃で5分間加温した。続いて、予め混和しておいた0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)0.1ml、10mM-4-APの0.05ml、1mg/ml濃度のペルオキシダーゼ溶液5μl、コレステロールエステラーゼ(シードモナス属の微生物由来)及びコレステロールオキシダーゼ(ノカルディヤ属の微生物由来)各10u/ml(終濃度；但し、以下の表3のn-OTG、n-HTG及びSMLでは0.4u/mlを使用した)を加えた。37℃で5分間放置した後、波長510nmにおける吸光度を測定した。また被検物質(ブロッカーなど)を添

加しないことを除いて前記と同様の操作によって吸光度測定を行い、この対照試験の値を100%として各脂質フラクションに対する反応阻害率を調べた。なお、表1～表3中の()内の値は、カラギナンでは終濃度0.1M塩化マグネシウム、他は全て終濃度1.3mM塩化マグネシウム共存下の反応阻害率を示す。なお、表1～表3(及び以下の実施例)において、被検物質の略号は以下の意味である。

CLA: アクリル酸とラウリルアクリレートとのコポリマーであり、CLAの後に記載する数字は、前記一般式(I)におけるxの数値を意味する。

MALA: メタクリル酸とラウリルアクリレートとのコポリマーであり、MALAの後に記載する数字は、前記一般式(I)におけるxの数値を意味する。

SOA: スチレンスルホン酸とオクチルアクリレートとのコポリマーであり、SOAの後に記載する数字は、単位分子当りのカルボン酸含有百分率の数値を意味する。*

10

* CSA: アクリル酸とスチリルアクリレートとのコポリマーであり、SOAの後に記載する数字は、単位分子当りのカルボン酸含有百分率の数値を意味する。

COA: アクリル酸とオクチルアクリレートとのコポリマーであり、SOAの後に記載する数字は、単位分子当りのカルボン酸含有百分率の数値を意味する。

SLA: スチレンスルホン酸とラウリルアクリレートとのコポリマーであり、SOAの後に記載する数字は、単位分子当りのカルボン酸含有百分率の数値を意味する。

n-OTG: n-オクチル- β -D-チオグルコピラノシドである。

n-HTG: n-ヘプチル- β -D-チオグルコピラノシドである。

SML: シュクロースモノラウレートである。

【0026】

【表1】

被検物質	終濃度 (%)	LDL フラクション 阻害率 (%)	HDL フラクション 阻害率 (%)
CLA50	0.001	44.1	83.2
	0.005	76.5	77.6
	0.01	93.1	70
CLA54	0.001	46.5	78
	0.005	91.3	63.1
	0.01	96.5	57.9
CLA65	0.001	71.8(91.7)	19.7(6.5)
	0.005	90.3	30.5
	0.01	95.5	68.1
CLA70	0.001	81.7(96.4)	9.6(-6.6)
	0.005	90.6(97.1)	19.3(3.2)
	0.01	93.3	78.2
CLA77	0.001	78.3(97.1)	18.1(5.9)
	0.002	87.8	43.5
	0.005	92.9	76.8
	0.01	96.2	84.6
CLA80	0.0002	66.4	1.3
	0.0005	78.2	11.8
	0.001	80.6(99.0)	32.8(5.6)
	0.002	89.2	56.7
	0.005	95.1	72.1
	0.01	95.7	90.2
CLA89	0.001	30.6(66.4)	11.1(-5.6)
	0.002	63.5	42.4
	0.01	89.4	70.6
CLA92	0.002	59.8	72.1
	0.01	88.6	89

【0027】

【表2】

被検物質	終濃度 (%)	LDL フラクション 阻害率 (%)	HDL フラクション 阻害率 (%)
MALA70	0.002	60.7(50.1)	32.4
	0.004	78.6(76.2)	47.6
MALA78	0.002	73.2(59.8)	14.5(0.8)
	0.004	83.9(91.2)	25.4(-1.7)
MALA83	0.002	86.6(95.1)	42.9(4.4)
	0.01	94.2	80.9
MALA89	0.001	55.4(83.5)	2.5
	0.002	100	3.6
MALA93	0.01	89.3	70.3
	0.001	41.9	16.6
SOA72	0.002	86.2(94.5)	29.7(9.7)
	0.005	80.9	75.6
SOA70	0.01	88.7	73.1
	0.001	68.3(77.0)	38.9(27.8)
CSA79	0.005	80.6	63.4
	0.001	58.5(30.6)	33.3
COA72	0.01	94.3	96.2
	0.05	29.3(63.0)	13.7(56.8)
SLA65	0.01	8.7	9.3
	0.005	43.1	40.3
	0.01	71.9	60.4

【0028】

【表3】

被検物質	終濃度 (%)	LDL フラクション 阻害率 (%)	HDL フラクション 阻害率 (%)
カラギナン κ	0.02	9.5(90.1)	2.2(-4.8)
	0.05	0.6(91.3)	1.7(-7.0)
カラギナン λ	0.01	5.4(91.4)	9.4(1.7)
	0.02	5.4(91.6)	8.9(2.4)
カラギナン β	0.05	7.1(91.4)	8.4(2.2)
	0.1	12.5(92.1)	9.5(4.4)
カラギナン γ	0.2	21.0(92.0)	9.6(8.7)
	0.01	3.6(91.6)	2.1(-4.8)
n-OTG	0.02	8.9(98.2)	6.5(-3.5)
	0.05	7.1(94.7)	13.1(3.5)
n-HTG	0.1	8.9(90.3)	4.2(3.5)
	0.2	14.2(89.1)	10.5(8.7)
SML	0.01	88	75.5
	0.04	92(94.1)	10.8(8.2)
SML	0.1	98.2(98.8)	8.2(7.6)
	0.2	96.6	7.6
SML	0.04	83.0(86.0)	97.5(97.8)
	0.1	92.2(83.5)	77.3(76.5)
SML	0.2	76.4	69.9
	0.02	42.8(42.3)	74.2(77.0)
SML	0.04	63.4(60.7)	73.5(75.6)
	0.12	71.5	77

【0029】表1～表3の結果から、カラギナン、CLA、及びMALAは、HDL フラクションのコレステロールと酵素との反応には影響しないが、LDL フラクションのコレステロールとの反応を阻害することがわかる。特に好ましい化合物は、水溶解性が良好な γ 型カラギナン及び λ 型カラギナン、前記一般式(I)で x が7

0～80のCLA、又は同じく x が83～93のMALAである。これらは、いずれもHDL フラクションのコレステロールと酵素との反応においては20%未満の阻害率を示すのに対し、LDL フラクションでは70%以上の阻害率を示した。また、塩化マグネシウムの存在下では、HDL フラクションのコレステロールと酵素との

反応においては10%未満の阻害率であるのに対し、LDLフラクションでは90%以上の阻害率を示し、以下のように実用的なものであった。

【0030】実施例3：反応経時変化

0.002%—MALA89、20mM塩化マグネシウム、及び1mM—HTIBAを含む40mMリン酸緩衝液(pH7.0)0.75mlに、試料として、実施例1の方法で得られたリピドフラクションHDLの20μl、LDLの10μl、VLDLの10μl、及び正常プール血清10μlを加え、37°Cで5分間加温した。これに0.5mM—4—AP、20μg/mlのペルオキシダーゼ、終濃度各10u/mlのコレステロールエステラーゼ(シードモナス属の微生物由来)、及び4u/mlのコレステロールオキシダーゼ(ノカルディヤ属の微生物由来)を含む50mMリン酸緩衝液(pH7.5)0.25mlを添加し、波長546nmの吸光度を測定した。また、ブロッカーにカラギナンを用いる場合には、0.002%—CLA80及び20mM塩化マグネシウムの代わりに、0.05%カラギナン及び100mM塩化マグネシウムを用いることを除いて、前記のCLA80を用いた場合と同様の操作によって吸光度測定を行った。他方、同じ検体についてゲルロ過カラムによる反応液体クロマトグラフィー法(HPLC法、W. Marz等, Clin. Chem., 39, 2276, 1993)での測定を実施し、その測定値と比較対照した。また、各測定法での標準物質としては、予め超遠心法で分画したHDLフラクションの総コレステロール値を酵素法で測定したものを用いた。血清9例の測定値を表4に示す。

【0031】実施例4：実検体の測定

CLA80をブロッカーに用いる場合、0.002%—CLA80、20mM塩化マグネシウム、及び1mM—ESPTを含む50mMリン酸緩衝液(pH7.5) *

検体	CLA80使用	カラギナン使用	HPLC法
血清1	20.7	21.9	22.1
血清2	36.6	35.4	36.2
血清3	29.2	28.3	28.5
血清4	46.1	40.7	44.7
血清5	41.3	38.6	40.3
血清6	36.2	35.6	36.2
血清7	67.9	65.6	70.9
血清8	33.5	35.1	32.4
血清9	27.8	26.4	26.5

単位: mg/dl

【0033】

【発明の効果】 試料(血清又は血漿)の遠心操作を行うことなく、簡便な操作で、HDLコレステロールの高精度の測定を行うことができる。

※

※【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明によるブロッカーの存在下における、HDL、LDL、VLDL、及び正常プール血清の吸光度の経時変化を示すグラフである。

* 0.75mlに血清10μlを加え、37°Cで5分間加温した。これに0.5mM—4—AP、0.4%n—OTG、20μg/mlのペルオキシダーゼ、4u/mlのコレステロールエステラーゼ(シードモナス属の微生物由来)、及び4u/mlのコレステロールオキシダーゼ(ノカルディヤ属の微生物由来)を含む50mMリン酸緩衝液(pH7.5)0.25mlを添加し、波長546nmの吸光度を測定した。また、ブロッカーにカラギナンを用いる場合には、0.002%—CLA80及び20mM塩化マグネシウムの代わりに、0.05%カラギナン及び100mM塩化マグネシウムを用いることを除いて、前記のCLA80を用いた場合と同様の操作によって吸光度測定を行った。他方、同じ検体についてゲルロ過カラムによる反応液体クロマトグラフィー法(HPLC法、W. Marz等, Clin. Chem., 39, 2276, 1993)での測定を実施し、その測定値と比較対照した。また、各測定法での標準物質としては、予め超遠心法で分画したHDLフラクションの総コレステロール値を酵素法で測定したものを用いた。血清9例の測定値を表4に示す。

【0032】

【表4】

【図1】

